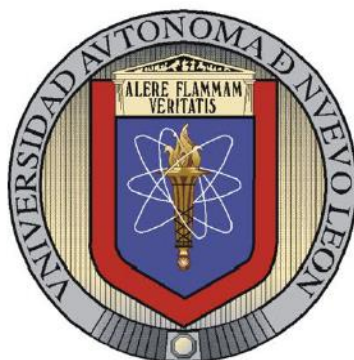


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ACTIVIDAD ANTAGONISTA *IN VITRO* DE MICROBIOTA DE BAHIA DE LOBOS
Y BAHIA DE GUASIMAS, SONORA Y PLAYA DEL CARMEN, QUINTANA ROO
CONTRA *Staphylococcus aureus* Y *Vibrio parahaemolyticus***

Por

Q.B.P. JESÚS MARIO IRACHETA VILLARREAL

Como requisito parcial para obtener el Grado de
**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA.**

J u n i o , 2 0 1 7

ACTIVIDAD ANTAGONISTA *IN VITRO* DE MICROBIOTA DE BAHIA DE LOBOS
Y BAHIA DE GUASIMAS, SONORA Y PLAYA DEL CARMEN, QUINTANA ROO
CONTRA *Staphylococcus aureus* Y *Vibrio parahaemolyticus*

Comité de Tesis

Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Presidente

Dr. Lucio Galaviz Silva
Secretario

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Dra. María Porfiria Barrón González
Vocal

Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

ACTIVIDAD ANTAGONISTA *IN VITRO* DE MICROBIOTA DE BAHIA DE LOBOS
Y BAHIA DE GUASIMAS, SONORA Y PLAYA DEL CARMEN, QUINTANA ROO
CONTRA *Staphylococcus aureus* Y *Vibrio parahaemolyticus*

Dirección de Tesis

Director

AGRADECMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Instituto Tecnológico de Sonora que hicieron posible la realización de esta investigación.

Un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado durante la realización de mi maestría.

Al igual, a todos los profesores investigadores los cuales me ayudaron y enseñaron durante el transcurso del post grado.

La Dra. Zinnia Judith Molina Garza, el Dr. Lucio Galaviz Silva, gracias por el apoyo, espacio y oportunidad otorgada en estos dos años. A los integrantes de mi comité, la Dra. Licet Villarreal Treviño, la Dra. María Porfiria Barrón González y la Dra. Patricia Tamez Guerra, gracias por sus enseñanzas, consejos y tiempo dados.

Al Dr. José Cuauhtémoc Ibarra Gámez del Instituto Tecnológico de Sonora por permitirme el uso de instalaciones y ayuda durante el trabajo realizado en Sonora.

Agradezco a mi familia por apoyarme en todo lo que hago y metas que me he propuesto, así como a todos mis compañeros y amigos, los cuales son los que me han impulsado a seguir adelante en mis estudios.

A mi padre y hermana Diana, por todo el apoyo, consejo, ayuda y tiempo dado. Muchas gracias por todo.

A mis compañeros de laboratorio, Karla, Alonso, Gaby, Ariel, Ricardo, Karen, Vida, Juan, Nelly, Ale, Mary y Mariana; con los cuales he pasado innumerables momentos y aprendido sin fin de cosas.

Mis amigos de preparatoria y diferentes hobbies: Chloe, Isai, Adriana, Sanjuana, Olivares, Cesar, Carlos, Mark, Cesar, Alfredo, Kike, Erick, Jackie, Pamela, Choche, Winie y Armando; gracias por todos los buenos momentos y salidas que hemos tenido y espero tener en el futuro.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi madre, que, aunque ya no se encuentre aquí, sé que siempre me ayudara en todo lo que realice.

A toda mi familia, por todo lo que han hecho por mí. Sé que siempre me apoyaran.

A los doctores Lucio y Zinnia por su apoyo y consejo incondicional, además de ayudarme a superarme académicamente.

A todos mis amigos compañeros y amigos, ustedes me ayudan a disfrutar el día a día de esta vida con todos los momentos que hemos pasado juntos.

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ITSON	Instituto Tecnológico de Sonora
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
TSA	Agar Soya Tripticasa
AM	Agar Marino
TCSB	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribosomal
NaCl	Cloruro de Sodio
OD	Densidad Óptica

ÍNDICE

Sección	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Enfermedades infecciosas de importancia clínica	3
2.2 Microorganismos resistentes a antibióticos	4
2.2.1 Microorganismos resistentes a antibióticos en México	5
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2.3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7
2.3 Actividad antagonista de aislamientos microbianos	8
2.4 Microbiota marina	10
2.4.1 Microbiota de ecosistemas marinos en México	11
2.4.2 Sustancias antimicrobianas producidas por microorganismos marinos	12
2.5 Capacidad productora de biopelícula microbiana	13
2.5.1 Usos y estudios de biopelículas microbianas	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo General	18
5.2 Objetivos Específicos	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1 Obtención de las cepas microbianas	19
6.2 Caracterización morfológica y bioquímica de los aislados microbianos	23
6.3 Evaluación de la actividad antagónica de los aislados microbianos	23
6.4 Identificación de las cepas aisladas por medio de biología molecular	25
6.5 Ensayo para la evaluación de actividad productora de biopelícula	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Obtención de las cepas microbianas	26
7.2 Caracterización morfológica y bioquímica de los aislados microbianos	27
7.3 Actividad antagonista de los aislados microbianos	28
7.4 Identificación por biología molecular a los aislados microbianos con actividad antagonista	31
7.5 Ensayo para la evaluación de producción de biopelícula	32
7.6 Alineamiento de secuencias	33

8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIÓN	40
10. PERSPECCTIVAS	41
11. BIBLIOGRAFÍA	42
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Área de las muestras colectadas.	19
2. Algas verdes colectadas de la Bahía de Lobos.	20
3. Algas rojas colectadas de la Playa del Carmen.	21
4. Jaibas colectadas de la Bahía de Lobos, en la cooperativa Comunidades Yaquis.	21
5. Algas y sedimentos colectados de la Bahía de Lobos.	21
6. Especímenes procesados para el aislamiento de su microbiota.	22
7. Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de los microorganismos.	22
8. Crecimiento colonial después de 48 horas del procesamiento de la muestra.	23
9. Diagrama de la evaluación de la actividad antagónica.	24
10. Resultado positivo para antagonismo.	30
11.. Resultados en mm de la actividad antagonista de los aislados microbianos contra a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> por el método de la estría cruzada.	30
12. Ensayo de la producción de biopelícula en microplaca.	32
13. Promedio de la densidad óptica para la producción de biopelícula de los cinco aislados microbianos con actividad antagonista.	32
14. Árbol filogenético del vecino más cercano de los aislados identificados.	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tipos de muestras colectadas en Bahía de Lobos, Bahía de Guasimas y Playa del Carmen.	20
2. Relación de las muestras colectados y aislados obtenidos.	26
3. Características básicas y morfológicas de los aislados microbianos.	27
4. Resultados en mm de la actividad antagonista por estría cruzada de los aislados microbianos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	28
5. Especies identificadas por biología molecular que mostraron actividad antagonista frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	31

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas por microorganismos emergentes y reemergentes son una problemática que se presenta con el paso del tiempo. La aparición de variedades microbianas resistentes a los tratamientos con antibióticos presenta dificultad en la lucha contra las enfermedades infecciosas, por lo que es necesario la búsqueda de nuevas alternativas para combatir a estos microorganismos. La capacidad de microorganismos provenientes de ecosistemas marinos para producir sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos es un área de investigación muy importante, la cual podría ayudar a combatirlos. Se aislaron 15 cepas las cuales mostraron actividad antagonista frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*. Estas 15 cepas se identificaron dentro del género *Bacillus*, donde las cepas con mayor capacidad antagonista frente a *S. aureus* y *V. parahaemolyticus* fueron las especies *Bacillus aerius* y *Bacillus pumilus*, respectivamente. Se les evaluó la capacidad productora de biopelícula, las cuales mostraron una producción moderada de esta. Nuestros resultados indican que bacterias marinas seleccionadas tienen potencial antagonista contra de microorganismos patógenos de importancia clínica.

ABSTRACT

Infectious diseases by emerging and reemerging microorganisms are problems that occur over time. The emergence of strains resistant to antibiotic treatments presents difficulties in the fight against infectious diseases, so it is necessary to search for new alternatives to combat these microorganisms. The ability of microorganisms from marine ecosystems to produce substances that inhibit the growth of others is a very important area of research, which could help to combat them. Fifteen strains were isolated which showed antagonistic activity against *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. These 15 strains were identified within the genus *Bacillus*, where the strains with the greatest antagonistic capacity against *S. aureus* and *V. parahaemolyticus* were *Bacillus aerius* and *Bacillus pumilus*, respectively. Their biofilm production capacity was evaluated, showing a moderate biofilm production by the tested isolates. Our results indicate that selected marine bacteria have antagonist activity against clinically important pathogenic microorganisms.

1. INTRODUCCIÓN

Numerosas enfermedades son causadas por la acción directa de microorganismos patógenos, ya sea por medio de una infección, dada por la colonización y crecimiento microbiano; o por una intoxicación, debida a la ingesta de sustancias conocidas como toxinas, las que causan al hombre un desequilibrio en su salud, ocasionando serias complicaciones. El uso de antibióticos contra estas enfermedades es la alternativa convencional que se recomienda para mejorar la salud humana, pero con el transcurso del tiempo se ha hecho mal uso de estos fármacos, permitiendo el desarrollo de microorganismos resistentes al antibiótico tradicional referido para su tratamiento. Esto ha llevado a un aumento considerable de enfermedades por microorganismos patógenos, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas en contra de estos microorganismos patógenos resistentes (Ahmad y Beg, 2000; Mesa Arango *et al.*, 2004).

Una de las alternativas para combatir la emergencia de patógenos resistentes, es el uso de microorganismos provenientes de ecosistemas marinos. Estos microorganismos poseen una gran cantidad y variedad de sustancias producidas como metabolitos secundarios, los cuales son capaces de frenar el crecimiento de otros microorganismos. Esto podría proveer una forma de combatir a los microorganismos patógenos resistentes de antibióticos, por lo que es importante el estudio de la microbiota marina y su capacidad antagónica frente a estos microorganismos (Bernan *et al.*, 1997; Reichenbach, 2001).

El estudio de la microbiota marina en aguas mexicanas es un área que ha adquirido suma importancia con el paso de los años. El aislamiento de microbiota con propiedades antimicrobianas e incluso anticancerígenas nos proporciona un panorama favorable para la búsqueda de nuevas vías para combatir los brotes actuales, y posibles, de enfermedades por microorganismos patógenos resistentes a antibióticos (Cetina *et al.*,

2010; Villarreal Gómez *et al.*, 2010; Torres Beltrán *et al.*, 2010; Velho-Pereira y Kamat, 2011).

La habilidad de los microorganismos de producir estructuras llamadas biopelículas ha sido estudiado debido a su gran importancia en el área clínica y estudios con el sistema inmune y resistencia a antibióticos (Donlan, 2001). Las biopelículas han tomado un gran interés con el paso del tiempo, teniendo diferentes propiedades las cuales pueden ser de gran ayuda para el hombre, como la producción de sustancias inhibitorias por parte de microorganismos provenientes de sustratos marinos (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005), siendo este tipo de sustancias una posibilidad de utilizar la microbiota marina y/o las sustancias que producen en la lucha contra las enfermedades infecciosas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades infecciosas de importancia clínica

Cualquier desequilibrio homeostático en general, o en alguna parte del cuerpo humano, se conoce como enfermedad. Una enfermedad se puede reconocer la mayoría de las veces por estar acompañada de síntomas y signos que hacen que éstas enfermedades sean únicas y características. Se pueden identificar las enfermedades por medio de la auscultación médica basada en la sintomatología clínica, y con el diagnóstico de certeza, haciendo uso del examen microbiológico e histopatológico. La patología se encarga del estudio de las enfermedades y del cómo actúan y se desarrollan, siendo este término conocido como patogénesis. Las enfermedades pueden ser hereditarias, metabólicas, inflamatorias, psicológicas o infecciosas. Una enfermedad infecciosa es causada por un patógeno, el cual es cualquier microorganismo que llegue a causar una enfermedad. Reportes de los últimos años mencionan que las infecciones causadas por microorganismos han aumentado debido a diferentes causas como: el aumento de pacientes inmunodeprimidos, tratamientos de larga duración con antibióticos de un amplio espectro, procedimientos como las diálisis y el uso de hormonas catabólicas, como los glucocorticoides, entre otros (Mesa *et al.*, 2004; Crowley, 2007).

Los microorganismos patógenos pueden causar dos tipos de enfermedades, siendo estas: intoxicaciones microbianas y enfermedades infecciosas. Las intoxicaciones microbianas ocurren debido a la ingesta de una toxina producido por el microorganismo patógeno. Una enfermedad infecciosa se presenta cuando un microorganismo coloniza un organismo, en este caso, al ser humano (Engelkirk y Duben-Engelkirk, 2008).

Los microorganismos siempre han estado en contacto con el hombre desde que este apareció en la tierra, por lo que no sería extraño el que se presentaran interacciones entre ellos, siendo estas para bien (microbiota intestinal), o perjudicando a uno de ellos, como es el caso de los microorganismos que causan patologías al ser humano. Actualmente,

las principales causas de muerte por enfermedades infecciosas son en el tracto respiratorio, enfermedades diarreicas, tuberculosis y las causadas por los virus (como el VIH, dengue, etc.). Estas enfermedades no siempre se presentan en todo el mundo, es necesario que los causantes de estas enfermedades, los cuales son los microorganismos patógenos, entren en contacto con las personas, para así poder causar la enfermedad (Beltz, 2011).

2.2 Microorganismos resistentes a antibióticos

Las enfermedades infecciosas son la principal causa de muertes prematuras a nivel mundial, causando alrededor de 50,000 decesos al día en la década del 2000. Los reportes de enfermedades por microorganismos patógenos resistentes a antibióticos han ido aumentando con el paso de los años. Esto, debido principalmente a la falta de control al momento de la dosificación de los fármacos y por los casos de automedicación (Ahmad y Beg, 2000).

Una de las razones por las que existe una falla terapéutica al emplear antibióticos para tratar pacientes con infecciones bacterianas es el surgimiento de bacterias resistentes a estos fármacos. La posible causa para que estos microorganismos desarrollen resistencia a estas sustancias puede resultar de mutaciones (por ejemplo, en el caso de virus y *Mycobacterium tuberculosis*), o por la adquisición de genes extraños a través de la transformación bacteriana o infección con plásmidos (Morens *et al.*, 2004); otro factor es el uso indiscriminado de los antibióticos, por ejemplo cuando se emplean antibióticos en el caso de infecciones de origen viral (gripe), hongos o parásitos (enfermedades diarreicas) (Silva, 2006). El uso inadecuado de antibióticos representa un riesgo para la salud y un desperdicio en los recursos económicos de los servicios de salud. Además de contribuir al aumento de la resistencia bacteriana que, a su vez, incrementa los gastos y la mortalidad por enfermedades infecciosas, por lo que es considerado un grave problema de salud pública (Dreser *et al.*, 2008).

En los hospitales y en la misma comunidad, los patógenos adquieren resistencia a antibióticos, formando parte de la lista microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Solórzano y Miranda, 2012).

La prevalencia de estos microorganismos y sus resistencias han sido estudiadas en países como Estados Unidos o comunidades como la Unión Europea. Sievert *et al.* (2013) recopiló el número de reportes de infecciones por microorganismos en el periodo del 2009-2010, donde los patógenos con mayor número de reportes fueron: *S. aureus* con 12 635 aislamientos, *E. coli* con 9351, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* con 6470, *P. aeruginosa* con 6111, *Enterococcus faecalis* con 5484, *Candida albicans* con 4275, *Enterococcus faecium* con 3314 y *Acinetobacter baumannii* con 1490.

2.2.1 Microorganismos resistentes a antibióticos en México

En México, a partir de la década de los 80, las bacterias Gram negativas *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. son de los patógenos responsables de infecciones nosocomiales, en conjunto con a una alta mortalidad (Aranda y Timaná, 2002). Las cepas de *E. coli* obtenidas de pacientes hospitalizados y de infecciones serias adquiridas en la comunidad alcanzan tasas cercanas de resistencia a antimicrobianos de un 50% (Gales *et al.*, 2012).

Un estudio nacional realizado por la Secretaría de Salud en el 2011 mostró los reportes de infecciones nosocomiales en el país. Se identificó en 914 infecciones a fue el *Enterobacter* spp. (38%) como el principal microorganismo aislado, seguido por *Staphylococcus aureus* (13%), *Pseudomonas* spp. (13%), *Staphylococcus coagulasa* negativo (8%), *Acinetobacter* spp. (7%), *Enterococcus* spp. (6%) y *Candida* spp. (5%).

Espinoza-Tavera *et al.* (2014) analizaron 284 muestras de infección en personas con pie diabético de un hospital de Tamaulipas. Con 382 cepas aisladas, los patógenos más prevalentes fueron *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El 63.9% de

S. aureus resultó resistente a la meticilina (MRSA), 44.1 % resistentes a la vancomicina y un 18.6 % resistentes al imipenem. *P. aeruginosa* demostró multifarmaco-resistencia.

Arias-Flores *et al.* (2016) estudiaron 48,377 cultivos de infecciones nosocomiales en unidades médicas de alta especialidad y de segundo nivel del país; de estos, 13 207 (27.3%) correspondieron a las unidades de alta especialidad y 35 170 (72.6%) a las unidades de segundo nivel. El microorganismo con mayor número de aislados fue *E. coli* con 8192 (16.9%), seguido de *Staphylococcus* coagulasa negativo con 6771 (14%) y *P. aeruginosa* 5275 (19.9%); los cuales fueron categorizados como los principales microorganismos a combatir.

2.2.2 *Staphylococcus aureus*

Bacteria Gram positiva con forma de coco, es un patógeno que, a lo largo del tiempo se ha adaptado a entornos en presencia de fármacos dirigidos a este, donde las variantes resistentes, siendo el resistente a meticilina el más frecuente, son resultado de la interacción con sus hospederos, tanto humanos como animales (Katayama *et al.*, 2000). Los tratamientos farmacológicos para MRSA son igual de limitados como la producción de nuevos antibióticos contra este patógeno (David y Daum, 2010).

La cantidad de material genético que se puede adquirir e intercambiar es numerosa e incluye genes de virulencia, transposones, elementos de inserción, o genes específicos de plásmidos que codifican para resistencia: tetA, str, smr, merAB, cadB, ermB, por mencionar algunos (Novales y Guadalupe, 2011).

Un estudio realizado por Velázquez-Meza *et al.* (2004) mostró una prevalencia del 14,9% de MRSA en 659 aislamientos del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS entre 1997 y 2003. Villaseñor-Martínez *et al.*, (2012) evaluaron la prevalencia de aislamientos de MRSA en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social en Guadalajara, Jalisco. Encontraron una prevalencia del 35% en un total de 483 aislamientos obtenidos de agosto de 2009 a febrero de 2011.

En la actualidad se presentan casos clínicos altamente complejos, donde el incremento de la incidencia de pacientes infectados con MRSA llega a ser mayor al 60% en algunos países, así como el de mayor prevalencia. La aparición de cepas con resistencia a vancomicina de este patógeno, el cual ya ha sido reportado en México, así como de los casos de resistencia a vancomicina y otros fármacos, presenta la necesidad de contar con nuevos tratamientos de primera línea que proporcionen seguridad y eficacia a este patógeno (de León-Rosales *et al.*, 2015).

Cada año se reportan cambios en los genes de resistencia, lo cual demuestra la habilidad de la bacteria para resistir nuevos fármacos, además de presentar patrones de adhesión complejos al tejido del hospedero, permitiéndole formar biopelículas y evadir la respuesta inmune (García-Moreno *et al.*, 2017).

2.2.3 *Vibrio parahaemolyticus*

Bacteria halofílica Gram negativa que se presenta naturalmente en ambientes marinos de regiones cálidas y templadas, la cual es una de las principales causas de gastroenteritis asociada a los mariscos en todo el mundo. Las enfermedades suelen ser esporádicas o asociadas a pequeños brotes. Presenta uno de los tiempos de generación más cortos de cualquier bacteria (<10 min) con una temperatura óptima de crecimiento de aproximadamente 37°C (Miles *et al.*, 1997).

Cepas provenientes de pacientes con gastroenteritis suelen presentar el gen de la hemolisina directa termostabílica (tdh), el gen de la hemolisina relacionada con tdh (trh), o ambos. Estos marcadores de virulencia ocurren con poca frecuencia en cepas aisladas de alimentos y muestras ambientales. Las cepas con genes tdh o trh representan menos del 3% de todas las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas del medio ambiente (Martínez-Urtaza *et al.*, 2010).

En México, no se han reportado brotes de manera, aunque se han atribuido casos aislados a esta bacteria, principalmente en base a los síntomas clínicos. Pocas cepas ambientales tdh+ han sido aisladas de agua y peces (Cabrera-García *et al.*, 2004), pero no se han examinado cepas en muestras clínicas.

Entre septiembre y octubre del 2004 se notificaron más de 1230 casos de gastroenteritis por cepas de *V. parahaemolyticus* O3:K6 en el sur de Sinaloa. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mostraron que la mayoría de las cepas (93.8%) eran resistentes a la ampicilina, pero sensibles al cloranfenicol (98.8%). La resistencia a múltiples fármacos aumentó significativamente de un 8.6% (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006; de Jesús Hernández-Díaz *et al.*, 2015).

Zavala-Norzagaray *et al.* (2015) evaluaron la presencia de especies del genero *Vibrio* y su resistencia a antibióticos en 64 tortugas marinas pertenecientes los estados de Baja California Sur y Sinaloa. De cepas aisladas de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. alginolyticus*, 94.1%, 33.4% y 100% demostraron resistencia a al menos un antibiótico comúnmente prescrito (principalmente a la ampicilina), respectivamente.

El genoma de esta especie contiene un gran número de genes que codifica transportadores de eflujo de fármacos probados y putativos (incluyendo el exportador de fármacos NorM identificado en *Vibrio* spp.), algunos de los cuales han demostrado desempeñar un papel importante en resistencia intrínseca a antimicrobianos, así como para influir en otras funciones como la virulencia (Morita *et al.*, 2016). Las infecciones por *V. parahaemolyticus* se han incrementado a nivel mundial, donde la principal causa está asociada a la ingesta de mariscos o alimentos crudos de origen marino (Velázquez-Roman *et al.*, 2012).

2.3 Actividad antagonista de aislamientos microbianos

La actividad antagonista, aplicada en la microbiología es la actividad que posee un microorganismo para detener el crecimiento de otro, usualmente por medio de sustancias producidas y liberadas en el medio por el microorganismo con la actividad.

Lertcanawanichakul y Sawangnop (2008) realizaron una comparación de los métodos de estría cruzada (Cross Streak Method) y de difusión en pocillos de agar para medir la actividad antagónica producida por cepas de *Bacillus* en contra de *S. aureus* y *E. coli*. Ambos métodos demostraron una inhibición de las dos bacterias por parte de las cepas de *Bacillus*, pero el método en estría cruzada obtuvo un mayor rango en inhibición microbiana.

Los estudios realizados por Villarreal-Gómez *et al.* (2010) mostraron la actividad antagónica de extractos bacterianos de especies de *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, actinobacterias entre otros, asociadas a algas, mostrando una actividad antagónica frente a una cepa patógena de *P. mirabilis*.

Cetina *et al.* (2010) aisló cepas de *Pseudoalteromonas* en aguas mexicanas, las cuales poseían actividad antagónica en contra de los microorganismos patógenos *S. aureus* y *P. aeruginosa*, además de que una de las cepas era productora de polímeros en medio con peptona y glucosa.

Pandey, Naik y Dubey (2011) demostraron la actividad antibacterial de la cepa An2 de *Acinetobacter* sp., la cual es patógena de peces. Realizando extractos celulares de esta bacteria, lograron la inhibición de *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* y *Alteromonas aurentia*. Estos extractos fueron analizados y mostraron la presencia de moléculas con potencial antimicrobiano.

Gautman *et al.* (2013) aislaron una cepa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* de sedimentos marinos en aguas de la India, la cual fue evaluada en contra de diferentes microorganismos patógenos para el humano. Obteniendo extractos bacterianos con solventes como hexano, cloroformo y etil acetato para los ensayos antimicrobianos, los resultados mostraron potencial en contra de los patógenos *Micrococcus luteus*, *S. aureus* y *Klebsiella pneumonia*.

Saha y Santra (2014) aislaron nueve cepas microbianas de un vertedero de residuos y realizaron ensayos de antagonismo entre las cepas, demostrando la presencia de actividad antagonista entre las mismas cepas. Estas cepas demostraron, además, la resistencia a diferentes metales pesados, como el arsénico, mercurio y cadmio.

2.4 Microbiota marina

En los últimos años el interés sobre los microorganismos marinos ha ido en aumento por el estudio de productos microbianos que muestran actividades antimicrobianas, antivirales, inmunosupresores, metabolitos inhibidores de enzimas, actividades antitumorales y anticoagulantes por mencionar algunos. Los productos marinos naturales pueden llegar a contener un rango amplio de metabolitos antibióticos con estructuras complejas las cuales no se presentan en los ambientes terrestres (Carte, 1993; Jensen y Fenical, 1994; Bernan *et. al.*, 1997; Reichenbach, 2001).

Los microorganismos presentes en los océanos y mares constituyen la base de la cadena alimenticia en estos ecosistemas, además de servir a los organismos superiores como microbiota acompañante. En estos ecosistemas se desarrollan microorganismos halófilos adaptados a aguas que contienen entre 25 y 40 g/L de cloruro de sodio. La mayoría de las bacterias son Gram negativas, móviles y flageladas, con la mayoría de estas como anaerobios facultativos y una muy poca proporción de microorganismos esporulantes. Tienen una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 20°C y se pueden encontrar microorganismos con capacidades para utilizar cualquier sustancia que esté presente en el agua, como azúcares, grasas, células, fenoles, entre otros (Marín-Galván, 2003).

En los estudios de la biodiversidad microbiana marina, se ha llegado a dificultar el encontrar métodos y medios adecuados para lograr un cultivo exitoso de estos microorganismos, por lo que se han desarrollado nuevas estrategias que combinan la tecnología acuícola de cultivo de especies, con técnicas de extracción y purificación de sustancias (Figuerola, 2005).

Las bacterias marinas más comunes son las pertenecientes a los géneros *Phragmidiothris*, *Hyphomicrobium*, *Cytophaga*, *Thiotrix*, *Agrobacterium*, *Aeromonas* y *Vibrio*, por mencionar algunas (Tortora *et al.*, 2007).

Dufourcq *et al.* (2014) aislaron y caracterizaron bacterias con actividades antimicrobianas del medio marino costero de Nueva Caledonia. De 493 aislamientos marinos, cuatro de ellos, pertenecientes al género *Pseudoalteromonas*, mostraron al menos una actividad contra cepas patógenas de referencia y multirresistentes.

2.4.1 Microbiota de ecosistemas marinos en México

En la República Mexicana se han aislado e identificado diversos microorganismos los cuáles han mostrado actividad antagonista frente a diferentes microorganismos de importancia clínica para el hombre.

Cetina *et al.* (2010) aislaron bacterias marinas del Golfo de México, de las costas de Campeche. Al momento de su identificación por medio de la secuenciación del gen 16S del rRNA, fueron caracterizadas como *Pseudoalteromonas* sp.

Villarreal-Gómez *et al.* (2010) evaluaron la actividad anticancerígena y antibacteriana de extractos de algas libres de bacterias y de bacterias asociadas a su superficie contra cepas patógenas de *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa*. Al momento de su identificación obtuvieron microorganismos de los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*

Torres-Beltrán *et al.* (2010) evaluaron el potencial del Golfo de California como fuente de cepas de actinobacterias bioactivas. Ellos aislaron 235 cepas de actinobacterias de las bahías Concepción y de los Ángeles. Por secuenciación del gen 16S del rRNA, se identificaron como *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Salinospora*. Utilizando la técnica de extracción de acetato de etilo, obtuvieron 69 extractos orgánicos y acuosos; 17 mostraron actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de mama y cérvix

(MCF7 y HeLa respectivamente). Tres de los extractos mostraron actividad antibiótica en contra de *S. aureus* resistente a la meticilina.

Velho-Pereira y Kamat (2011) utilizaron la técnica de estría cruzada para evaluar la actividad antimicrobiana de 30 cepas de actinobacterias, obteniendo un resultado de 28 cepas con actividad antimicrobiana en contra de patógenos Gram positivos, Gram negativos y levaduras resistentes a antibióticos. Los géneros de las especies que mostraron esta actividad correspondieron a *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Actinomadura*.

2.4.2 Sustancias antimicrobianas producidas por microorganismos marinos

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, estudios en bacterias y hongos derivados del suelo demostraron que los microorganismos son una rica fuente de sustancias bioactivas estructuralmente únicas (Fenical, 1993). Las bacterias marinas son una rica fuente de metabolitos bioactivos, por lo que, a lo largo de los años, se han desarrollado extensos programas para detectar y aislar nuevos metabolitos de microorganismos marinos (Debbab *et al.*, 2010).

A partir de una muestra de sedimento recogida en la Laguna Cocos, Guam, se aisló una cepa del género *Marinispora*. La investigación química de esta cepa proporcionó el compuesto 2-alkilideno-5-alkil-4-oxazolidinona, el cual posee actividades antimicrobianas de amplio espectro como las del antibiótico comercial linezolid (Barbachyn y Ford, 2003).

Cultivos de *Brevibacillus laterosporus* produjeron un nuevo lipopéptido denominado tauramamida, con actividad selectiva contra el patógeno humano Gram-positivo *Enterococcus* sp y *Staphylococcus aureus* multirresistente. Tauramamida es un nuevo antibiótico lipopeptídico que contiene dos aminoácidos D y se acila en el extremo N-terminal (Desjardine *et al.*, 2007).

En las últimas décadas, el número de metabolitos secundarios reportados con actividades biológicas de bacterias y hongos marinos ha sido constante, lo que refleja la creciente atención por grupos académicos e industriales. Solamente en 2007 se describieron 961 nuevos compuestos de microorganismos marinos, lo que refleja un aumento del 24% en comparación con el número de compuestos reportados en años anteriores (Blunt *et al.*, 2009).

En el 2010, Debbab *et al.* realizaron una revisión de reportes de los años 2007-2009 sobre metabolitos producidos por microorganismos marinos, recopilando 101 compuestos con actividad biológica frente a hongos, levaduras y bacterias de importancia clínica.

Mayer *et al.* (2013) realizaron una revisión sobre los compuestos marinos reportados durante los años 2009 y 2011. Treinta y cinco estudios informaron productos naturales marinos antibacterianos aislados de un grupo diverso de bacterias marinas, ascidias, briozoos, esponjas, corales blandos y algas; diez estudios con actividad antifúngica; 32 con actividad antiprotzoaria; y finalmente, tres informes de actividad antiviral.

El descubrimiento de nuevos compuestos marinos con actividad biológica es uno de los enfoques más importantes de la ciencia marina en la actualidad. Los microorganismos marinos ofrecen un alto potencial en el descubrimiento de fármacos. Los biorreactores a gran escala podrían permitir el cultivo en masa para satisfacer las exigentes demandas de las industrias farmacéuticas (Romano *et al.*, 2017).

2.5 Capacidad productora de biopelícula microbiana

Las biopelículas son comunidades ubicuas de bacterias estrechamente asociadas encerradas en una matriz extracelular. Esta matriz, compuesta de diversas secreciones microbianas, tiene la habilidad de adherirse a superficies tanto biológicas, como no biológicas. Estas biopelículas se desarrollan cuando los microorganismos se adhieren a una superficie y comienzan a producir polímeros extracelulares que facilitarán la

adhesión y proveerán la matriz estructural (Donlan, 2001). Las biopelículas el tipo más frecuente de crecimiento microbiano en la naturaleza y son cruciales para el desarrollo de infecciones clínicas. Un aumento en el interés de las biopelículas en los últimos años viene en gran parte del reconocimiento de su papel en la protección de microorganismos del sistema inmunológico, los antimicrobianos, la depredación y el estrés (Burton *et al.*, 2007).

La formación de biopelícula se debe por la colisión aleatoria de células con una superficie, lo cual representa la unión celular inicial con la adhesión promovida por la interacción entre una o más estructuras celulares y la superficie. Estas estructuras celulares incluyen apéndices de proteína, como el pili o flagelos; proteínas de la superficie celular y polisacáridos. La unión de una célula a una superficie es una señal para la expresión de genes específicos para la formación de biopelícula. Estos incluyen genes que codifican proteínas sintetizadoras de moléculas de señalización intercelulares e inician la formación de la matriz. Una vez comprometida con la formación de la biopelícula, una célula previamente planctónica, pierde sus flagelos y se convierte en una célula inmóvil. El interruptor del estado planctónico al crecimiento de biopelícula se sabe que está provocado por la producción de monofosfato de guanosina dimérica cíclico (c-di-GMP), formado a partir de dos moléculas de guanosina trifosfato (GTP). La mayoría de las bacterias utilizan c-di-GMP como segundo mensajero, una molécula de comunicaciones. Estos mensajeros son moléculas reguladoras intracelulares que transmiten señales desde el medio ambiente (primer mensajero) a la maquinaria celular que genera la respuesta apropiada, incluyendo la motilidad, la virulencia y la formación de biopelículas. Durante la transición entre estados de crecimiento planctónicos y sésiles, el c-di-GMP se une a las proteínas que modulan la actividad del motor flagelar y a las enzimas que hacen la matriz extracelular de la biopelícula (Madigan *et al.*, 2011).

2.5.1 Usos y estudios de biopelículas microbianas

Bacillus subtilis ha servido durante mucho tiempo como un organismo modelo robusto para examinar los mecanismos moleculares de la formación de biofilm, y una serie de estudios han puesto de manifiesto que este proceso está regulado por varias vías integradas, y genes como *tapA*, *sipW*, *tasA*, *pgsB*, entre otros (Vlamakis *et al.*, 2013).

La bacteria marina *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* desarrolla biopelícula oleolíticos, sobre una gran variedad de sustratos hidrófobos, incluyendo hidrocarburos, alcoholes grasos, ácidos grasos, triglicéridos y ésteres de cera. Esto hace que su degradación sea fácil, lo que ayuda a los flujos de carbono dentro del océano, los cuales son casi insolubles en fase acuosa (Mounier *et al.*, 2014).

D'alvise *et al.* (2014) realizaron una evaluación de la formación de biopelícula y la producción de antibióticos en la bacteria *Ruegeria mobilis*, donde un gen introducido de diguanilato ciclasa aumentó el c-di-GMP y mejoró la formación de biopelícula y producción del ácido tropoditico (TDA), el cual es considerado un potente antibiótico, y ha sido reportada como una sustancia producida por este microorganismo.

Un nuevo biofloculante producido por una cepa *Bacillus agaradhaerens* tolerante a la sal, alcalinizante y formadora de biopelícula tiene el potencial de ser utilizado en la recolección de microalgas como *Chlorella minutissima* o como agente bacteriano para fortalecer el tratamiento de aguas residuales alcalinas (Liu *et al.*, 2015)

Hamza *et al.* (2016) investigó el potencial de un cultivo marino tropical *Bacillus licheniformis* contra *Vibrio harveyi* y *Pseudomonas aeruginosa*. Un sobrenadante libre de células (CFS) de *B. licheniformis* obtenido de un cultivo con producción de biopelícula inhibió *V. harveyi* y *P. aeruginosa*. Además, el CFS exhibió actividad antimicrobiana y la muerte celular mediada a través de la disrupción de membrana citoplásmica.

3. JUSTIFICACIÓN

Se requieren nuevas alternativas para el control de las enfermedades infecciosas debido a la emergencia de cepas microbianas patógenas resistentes a antibióticos en los últimos años; el uso de microorganismos marinos del género *Bacillus* o sus metabolitos producidos que presenten actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, es una alternativa ante los recientes casos de infecciones reportados en el país.

4. HIPÓTESIS

La microbiota de ecosistemas marinos de la Bahía de Lobos y Bahía de Guasimas en el estado de Sonora, México, posee propiedades antagonistas frente a microorganismos patógenos de importancia clínica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar microorganismos provenientes de muestras de ecosistemas marinos de la Bahía de Lobos y Bahía de Guasimas en el estado de Sonora, y Playa del Carmen, México, que presenten una respuesta antagonista frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

5.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar morfológica y bioquímicamente la microbiota proveniente de las muestras colectadas.
2. Evaluar la respuesta antagonista de la microbiota aislada frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.
3. Identificar por biología molecular los microorganismos de la microbiota que presenten una actividad antagonista frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.
4. Evaluar la habilidad de producción de biopelícula de los microorganismos antagonistas y determinar su uso potencial como agente o producto antimicrobiano.

6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención de las cepas microbianas

Se realizaron muestreos el 28 y 29 de agosto del 2015 en Bahía de Lobos (27°15'42.0"N 110°25'34.6"W) y Bahía de Guasimas (27°15'42.0"N 110°25'34.6"W) en el estado de Sonora, con ayuda del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Se realizó un muestreo en la playa del Carmen (20°39'24.5"N 87°02'24.2"W), Quintana Roo, el 17 de junio del 2016 (Figura 1). Las muestras colectadas se pueden observar en la Tabla 1, Figuras 2, 3, 4 y 5. Los moluscos y crustáceos procesados, los medios de cultivo y el crecimiento colonial de las diluciones, se puede observar en las Figuras 6 y 7, respectivamente.

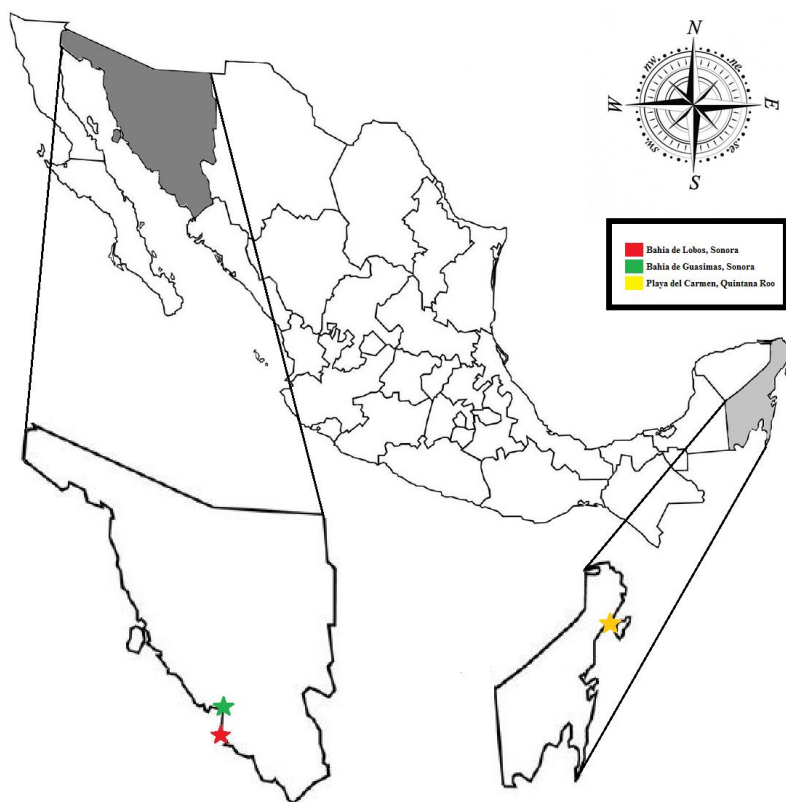


Figura 1. Área de las muestras colectadas (recuadro negro).

Tabla 1. Tipos de muestras colectadas en Bahía de Lobos, Bahía de Guasimas y Playa del Carmen.

Localidad	Temperatura y densidad de oxígeno	Fecha de muestreo	Tipo de muestra	Nombre científico	Clave para cepa
Bahía de Lobos	33°C 8.5 mg/L O ₂	28/08/2015	Alga verde	<i>Enteromorpha</i> sp.	BLAV
			Alga marrón	<i>Gracilariopsis</i> sp.	BLAN
			Sedimento café	-	BLSC
			Sedimento oscuro	-	BLSN
			Jaiba (intestino, branquias y hepatopáncreas)	<i>Callinectes arcuatus</i>	BLJI BLJB BLHP
			Caracol grande	<i>Natica chemnitzii</i>	BLIC
			Baba de medusa	<i>Stomolophus meleagris</i>	GBM
Guasimas	31°C 7.8 mg/L O ₂	29/08/2015	Almeja china	<i>Veneridae iliochione</i>	GACH
			Almeja blanca	<i>Veneridae dosinia</i>	GAB
			Caracol chino rosa	<i>Phyllonotus erythrostoma</i>	GCCH
			Ostión	<i>Crassostrea</i> sp.	GO
			Cangrejo ermitaño	<i>Clibanarius panamensis</i>	GCE
Playa del Carmen	31°C 8.1 mg/L O ₂	17/06/2016	Alga roja globosa	Rhodophyta	G
			Alga roja delgada	Rhodophyta	D



Figura 2. Algas verdes colectadas de la Bahía de Lobos.



Figura 3. Algas rojas colectadas de Playa del Carmen.



Figura 4. Jaibas colectadas de la Bahía de Lobos, en la cooperativa Comunidades Yaquis.



Figura 5. Algas y sedimentos colectados de la Bahía de Lobos.



Figura 6. Especímenes procesados para el aislamiento de su microbiota.



Figura 7. Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de los microorganismos.

Las muestras fueron procesadas y sembradas en medios de cultivo agar soja tripticasa (TSA) NaCl 2% y Agar Marino (AM). Las muestras de jaiba, almeja, caracol chino rosa y cangrejo ermitaño recibieron un procesamiento posterior, realizándose una disección de estos ejemplares para retirarles el caparazón o concha que los protegía, en

condiciones estériles para evitar contaminación. En el caso de la jaiba, se le retiraron para análisis, las branquias y hepatopáncreas; al cangrejo ermitaño se le retiraron los ciegos intestinales. Estas muestras, junto con las de algas y sedimento, fueron procesadas triturándolas con un mortero estéril, posteriormente se pasó un gramo de esta a un tubo con solución salina, al que después se haría una serie de diluciones seriadas, donde las diluciones 10^4 y 10^5 se sembraron en medios de TSA NaCl 2% y AM e incubaron a 33°C por 48 h (Figura 8). Posteriormente, se seleccionaron las colonias microbianas con base en la morfología colonial de cada cepa para obtener cultivos axenicos.

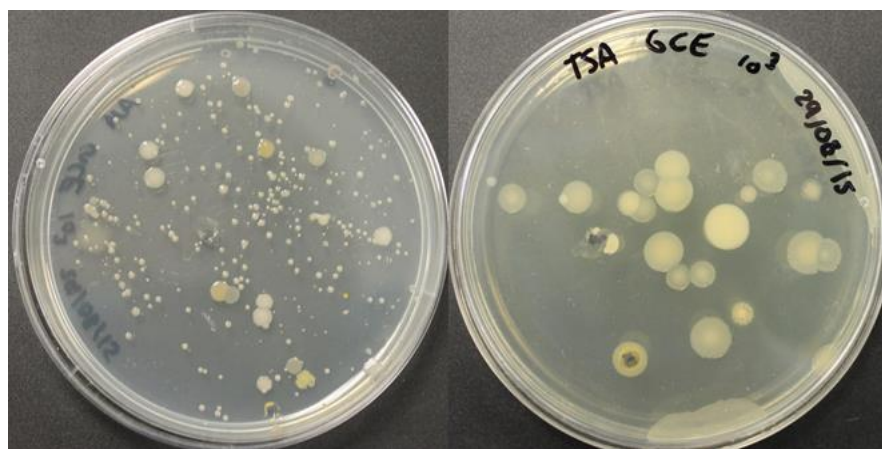


Figura 8. Crecimiento colonial después de 48 horas del procesamiento de la muestra. Izquierda: agar marino. Derecha: agar soya tripticasa.

6.2 Caracterización morfológica y bioquímica de los aislados microbianos

A los microorganismos aislados se les realizó una tinción de Gram y observación al microscopio en 100x para diferenciar su morfología; así mismo se sembraron en diferentes medios y caldos para ver sus características de propagación en AM, TSA 2% NaCl, agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y TSB 2% NaCl). También se realizaron pruebas de oxidasa y catalasa.

6.3 Evaluación de la actividad antagonica de los aislados microbianos

Se evaluó la respuesta antagonica frente a bacterias de importancia clínica para el hombre: *Staphylococcus aureus* (aislado de aspirado traqueal de paciente, proporcionado por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad Ciencias Biológicas) y

Vibrio parahaemolyticus ATCC 27519; proporcionadas por el laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Facultad de Ciencias Biológicas. Se utilizó el método de estría cruzada (Saha y Santra, 2014). A partir de cultivos de 18-24 horas en placas de TSA (2% NaCl) de las cepas reactivadas, se tomaron de 3-5 colonias microbianas y se preparó una suspensión de 1 mL con solución salina estéril a una escala 1.0-1.5 de McFarland.

Se realizó en el centro de las placas de TSA (2% NaCl), una estría longitudinal con un hisopo estéril impregnado con la bacteria a evaluar, y se incubó por 48 horas a 28-32 °C. Transcurrido este tiempo se realizaron canales por donde pasaron las bacterias a desafiar utilizando un hisopo estéril. Se preparó del mismo modo una suspensión con estas bacterias y se sembró una estría simple en un ángulo de 90° atravesando la zona del microorganismo aislado. Se incubó por 24 h a 28-32 °C y se observaron los resultados, con la medición de zonas de inhibición que se hayan obtenido empleando un Vernier (Figura 9).

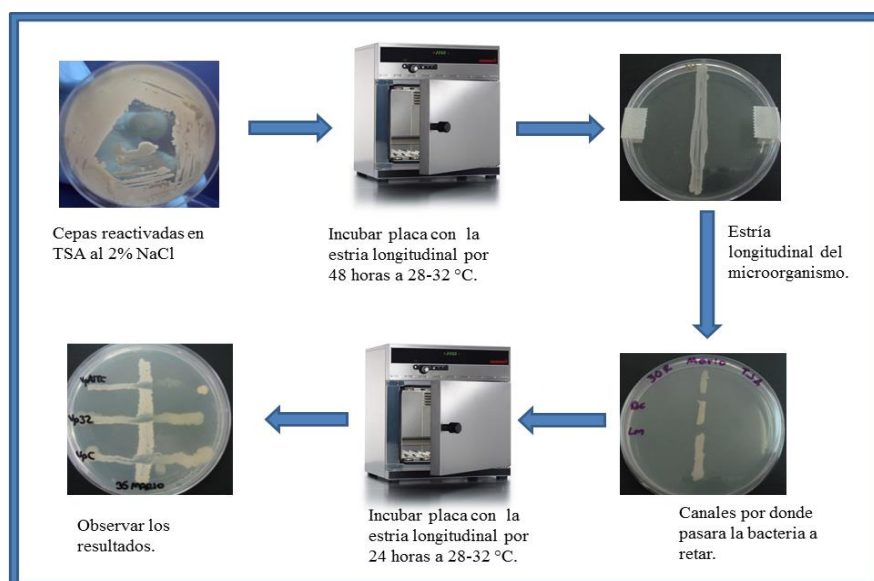


Figura 9. Diagrama de la evaluación de la actividad antagonica.

6.4 Identificación de las cepas aisladas por medio de biología molecular

Los microorganismos que resultaron positivos para actividad antagonista fueron enviados a la empresa MacroGen, Inc. (Korea) para ser sometidos a una secuenciación de la región 16S rRNA para identificar su especie, utilizando los *primers* 785F y 907R para este proceso.

6.5 Ensayo para la evaluación de actividad productora de biopelícula

Se realizó una evaluación y cuantificación de la producción de biopelícula a los microorganismos que presentaron actividad antagonista frente a microorganismos de importancia clínica, por medio del método descrito por Knoblock *et al.* (2001) para evaluar la producción de biopelícula de *S. aureus*.

De un cultivo incubado durante la noche a 30-33°C en TSB NaCl 2% se realizó una dilución 1:100 en TSB NaCl 2%. La muestra diluida (120 µl) se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo en U. Las placas se incubaron aeróbicamente a 30-33°C durante 24 horas. Los cultivos se retiraron y se lavó los pocillos dos veces con 200 µl de (pH 7,4) para eliminar las células no adherentes, Las placas se secaron en una posición invertida. Las bacterias adherentes se fijaron con 200 µl de etanol (90%) por dos minutos, se decantaron, se secaron a temperatura ambiente y se tiñeron con 100 µl de violeta de cristal durante 10 minutos. Posteriormente se enjuagó se lavó tres veces con agua destilada estéril (200 µl). Por último, se eliminó el agua y se secaron al aire. Se realizaron 10 repeticiones para cada cepa evaluada. La absorbancia se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro ASYS UVM 340. La capacidad de adhesión puede ser fuerte ($OD \geq 1$), moderada ($0.1 \leq OD_{595} < 1$) o débil ($OD_{595} < 0.1$).

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de las cepas microbianas

Se aislaron 42 cepas, como se muestra en la Tabla 2, de las 16 muestras procesadas, las cuales fueron preservadas en el ITSON para ser enviadas a la Facultad de Ciencias Biológicas y continuar la investigación. Estas 42 cepas estaban compuestas de tres cocobacilos Gram positivos (7.14%), cuatro cocos Gram positivos (9.5%) y 35 bacilos (11 Gram negativos [26.19%] y 24 Gram positivos [57.14%]).

Tabla 2. Relación de las muestras colectados y aislados obtenidos.

Numero de cepas aisladas	Clave de la muestra
1	BLAV
4	BLAN
4	BLSC
4	BLSN
1	BLJI
3	BLJB
2	BLHP
1	BLIC
1	GBM
3	GACH
1	GAB
1	GCCH
2	GO
4	GCE
7	G
3	D

7.2 Caracterización morfológica y bioquímica de los aislados microbianos

La morfología colonial y los resultados de la tinción de Gram se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Características básicas y morfológicas de los aislados microbianos.

Cepa	Clave	Gram	Morfología	Catalasa	Oxidasa	Morfología colonial
1	BLSC-01	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
3	BLSC-03	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
5	BLSC-05	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, blanco opaco, lobulado
6	BLJI-01	+	Coco	+	-	Pequeñas, redondas, blanco opaco
8	BLJHP-01	+	Bacilo	+	-	Naranja claro, opaco, crecimiento indefinido
9	BLAN-01	+	Bacilo	+	-	Plana, aspecto de cráter, blanco opaco
12	BLSN-01	+	Coco	+	-	Redondas, blanco opaco
13	BLSN-02	+	Coco	+	-	Amarillo opaco, redondo, pequeño
20	BLJHP-02	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
21	BLJB-01	+	Coco	+	-	Pequeñas, redondas, blanco opaco
22	BLJB-02	-	Bacilo	+	-	Cremosa, crecimiento indefinido, blanco opaco
25	BLSN-03	+	Bacilo	+	-	Plana, transparente, redonda
26	BLSN-04	+	Bacilo	+	-	Redondas, crema opaco
32	BLAN-07	+	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
38	BLIC-05	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
40	BLSC-09	+	Bacilo	+	-	Naranja claro, opaco, crecimiento plano
41	GBM-02	+	Bacilo	-	-	Naranja claro, opaco, crecimiento plano
42	GACH-01	+	Bacilo	+	-	Naranja claro, opaco, crecimiento plano
43	GO-01	+	Bacilo	+	-	Redondas, crema opaco
44	GO-02	+	Bacilo	+	-	Pequeñas, redondas, crema opaco
45	GCE-03	+	Bacilo	+	-	Redondas, crema opaco
46	GCE-04	+	Bacilo	+	-	Crema, irregular, pequeño
48	GCE-06	-	Bacilo	+	-	Rojo claro, irregular, pequeño
CM48	GCE-07	+	Bacilo	+	-	Plana, aspecto de cráter, blanco opaco
50	BLAV-03	-	Bacilo	+	-	Redondo, grande, opaco
51	BLAN-08	+	Coco Bacilo	+	-	Cremosa, redonda, blanco opaco

51T	BLAN-09	+	Coco Bacilo	+	-	Cremosa, redonda, blanco opaco
52-14	BLJB-05	+	Bacilo	+	-	Plana, aspecto de cráter, blanco opaco
53	GAB-01	+	Bacilo	+	-	Aspecto de cráter, con aspecto lobulado/estriado, crema opaco
54	GACH-02	-	Bacilo	-	+	Redondo, grande, opaco
55	GACH-03	+	Bacilo	-	-	Plana, transparente, redonda
56	GCCH-01	+	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
D2	D-02	-	Bacilo	+	+	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
D3	D-03	-	Bacilo	+	+	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
D5	D-05	-	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
G1	G-01	-	Bacilo	+	+	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
G2	G-02	-	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, naranja opaco
G3	G-03	-	Bacilo	+	+	Pequeñas, redondas, crema opaco
G4	G-04	+	Coco Bacilo	+	+	Cremosa, crecimiento indefinido, blanco opaco
G5	G-05	-	Bacilo	-	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
G6	G-06	+	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema
G6.2	G-07	+	Bacilo	+	-	Redondo, difuso, aspecto de cráter, crema

7.3 Actividad antagonista de los aislados microbianos

Los 42 aislados fueron sometidos a una evaluación de actividad antagonista en contra de una cepa ATCC de *V. parahaemolyticus* y una de *S. aureus* aislada de un paciente por aspirado traqueal, por el método de la estría cruzada. Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados en mm de la actividad antagonista por estría cruzada de los aislados microbianos frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Cepa	Clave	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	BLSC-01	A	A	A	A	A	A
3	BLSC-03	12	12	12	14	13	13
5	BLSC-05	12	12	13	13	15	14
6	BLJI-01	A	A	A	A	A	A
8	BLJHP-01	A	A	A	A	A	A
9	BLAN-01	18	17	17	13	13	14
12	BLSN-01	A	A	A	A	A	A

13	BLSN-02	A	A	A	A	A	A
20	BLJHP-02	A	A	A	A	A	A
21	BLJB-01	A	A	A	A	A	A
22	BLJB-02	A	A	A	A	A	A
25	BLSN-03	5	7	7	A	A	A
26	BLSN-04	15	14	16	10	11	11
32	BLAN-07	12	15	15	9	16	14
38	BLIC-05	17	17	17	2	4	2
40	BLSC-09	A	A	A	A	A	A
41	GBM-02	A	A	A	A	A	A
42	GACH-01	A	A	A	A	A	A
43	GO-01	18	17	20	9	9	9
44	GO-02	16	17	17	10	14	14
45	GCE-03	12	12	12	15	15	14
46	GCE-04	16	16	18	16	17	15
48	GCE-06	A	A	A	A	A	A
CM48	GCE-07	16	16	16	14	14	13
50	BLAV-03	A	A	A	A	A	A
51	BLAN-08	A	A	A	A	A	A
51T	BLAN-09	A	A	A	A	A	A
52-14	BLJB-05	17	19	19	15	15	17
53	GAB-01	A	A	A	A	A	A
54	GACH-02	A	A	A	A	A	A
55	GACH-03	A	A	A	A	A	A
56	GCCH-01	A	A	A	A	A	A
D2	D-02	A	A	A	A	A	A
D3	D-03	A	A	A	A	A	A
D5	D-05	A	A	A	A	A	A
G1	G-01	A	A	A	A	A	A
G2	G-02	A	A	A	A	A	A
G3	G-03	A	A	A	A	A	A
G4	G-04	A	A	A	A	A	A
G5	G-05	A	A	A	A	A	A
G6	G-06	14	15	15	11	11	10
G6.2	G-07	21	20	19	A	A	A

A= Ausencia de actividad antagonista. R: Numero de repetición. Cepas con actividad resaltadas en negritas.

Se obtuvieron 15 cepas con actividad antagonista frente a las bacterias evaluadas, donde en la Figura 10 se pueden observar resultados positivos. Dos de estas solo mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y 13 tuvieron actividad contra las dos bacterias.

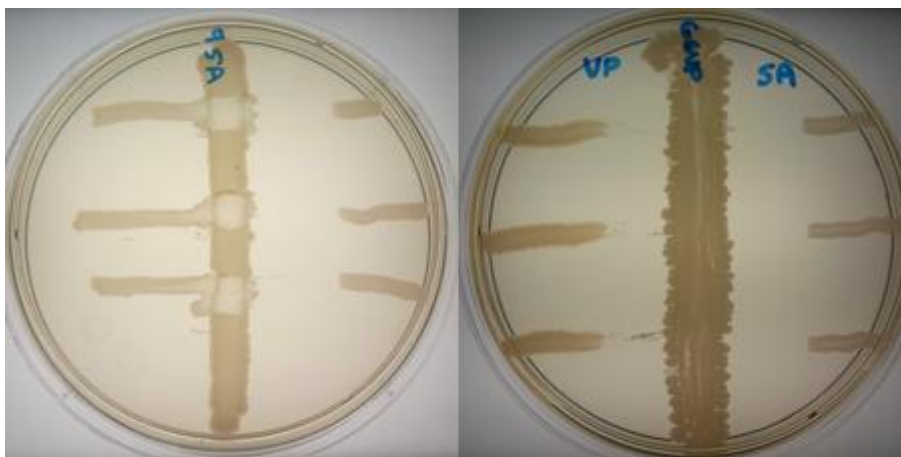


Figura 10. Resultado positivo para antagonismo.

De las 15 cepas con actividad, la que presentó mayor inhibición frente a *S. aureus* fue la cepa G6.2, la cual mostro un promedio de 20 milímetros de inhibición al momento de realizar los ensayos. Las cepas 52-14 y 46 obtuvieron los promedios más altos en contra de *V. parahaemolyticus* (Figura 11).

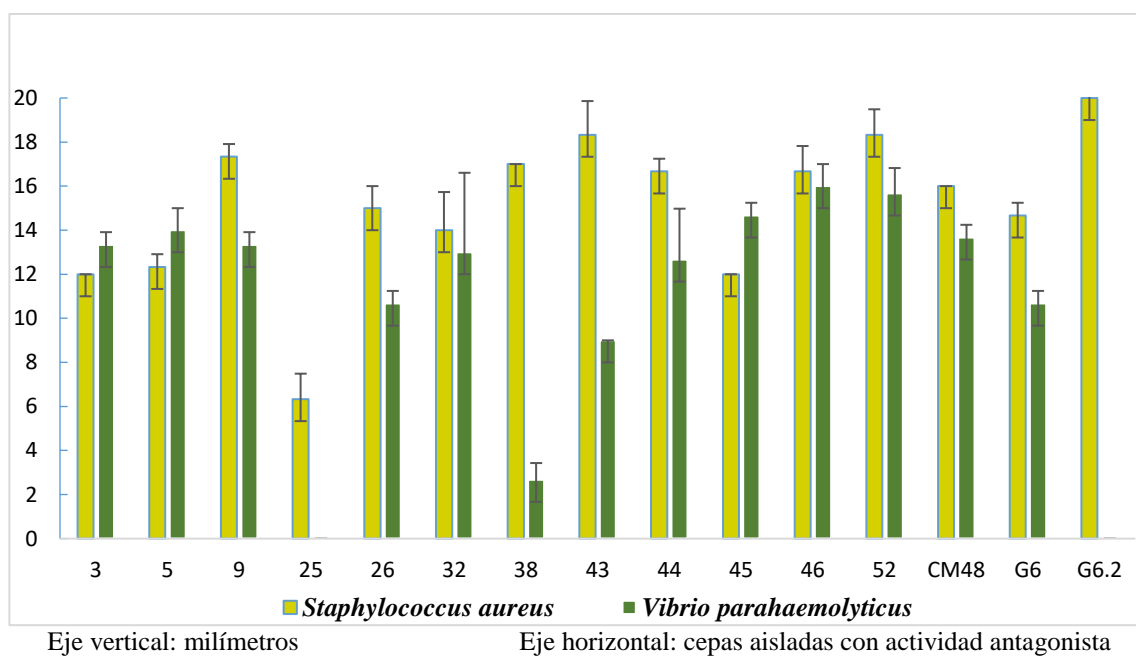


Figura 11. Resultados en mm de la actividad antagonista de los aislados microbianos contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* por el método de la estría cruzada.

7.4 Identificación por biología molecular a los aislados microbianos con actividad antagonista

Las cepas con actividad fueron enviadas a la empresa MacroGen, Inc. en Korea para su identificación. Las especies identificadas pertenecieron al género *Bacillus*. Seis de las cepas fueron *B. pumilus*, tres *B. altitudinis* y las restantes *B. oryzicola*, *B. safensis*, *B. boroniphilus*, *B. paralicheniformis* y *B. aerius* (Tabla 5). La cepa 32 fue identificada como *Bacillus lentus* por medio del kit de identificación API 50 CH (Biomerieux).

Tabla 5. Especies identificadas por biología molecular que mostraron actividad antagonista frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Cepa	Clave	Especie	Primer	Porcentaje GC
3	BLSC-03	<i>Bacillus pumilus</i>	785F	57.0
			907R	54.0
5	BLSC-05	<i>Bacillus oryzicola</i>	785F	56.0
			907R	55.0
9	BLAN-01	<i>Bacillus safensis</i>	785F	53.0
			907R	56.0
25	BLSN-03	<i>Bacillus boroniphilus</i>	785F	54.0
			907R	56.0
26	BLSN-04	<i>Bacillus pumilus</i>	785F	54.0
			907R	54.0
38	BLIC-05	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	785F	62.0
			907R	58.0
43	GO-01	<i>Bacillus pumilus</i>	785F	55.0
			907R	54.0
44	GO-02	<i>Bacillus altitudinis</i>	785F	55.0
			907R	55.0
45	GCE-03	<i>Bacillus altitudinis</i>	785F	55.0
			907R	55.0
46	GCE-04	<i>Bacillus pumilus</i>	785F	55.0
			907R	55.0
52-14	BLJB-05	<i>Bacillus pumilus</i>	785F	53.0
			907R	56.0
CM48	GCE-07	<i>Bacillus altitudinis</i>	785F	55.0
			907R	54.0
G6	G-06	<i>Bacillus pumilus</i>	785F	55.0
			907R	58.0
G6.2	G-07	<i>Bacillus aerius</i>	785F	60.0
			907R	55.0
32	BLAN-07	* <i>Bacillus licheniformis</i>	API 50 CH	
		* <i>Bacillus lentus</i>		

*Realizadas con el kit API 50 CH

7.5 Ensayo para la evaluación de producción de biopelícula

De las 15 cepas con actividad antagonista, se seleccionaron cinco que presentaran el mayor promedio de inhibición frente a las dos bacterias evaluadas para la evaluación de producción de biopelícula por medio del método de Knoblock *et al.* (2001). Se realizaron 10 repeticiones para cada cepa (Figura 12). Los resultados demostraron una producción moderada de biopelícula para las cinco cepas como lo menciona la literatura, obteniendo una densidad óptica entre 0.1 y 1 (Figura 13).



Figura 12. Ensayo de la producción de biopelícula en microplaca. De arriba abajo: Cepas 52-14, G6.2, 45, 46 y CM48.

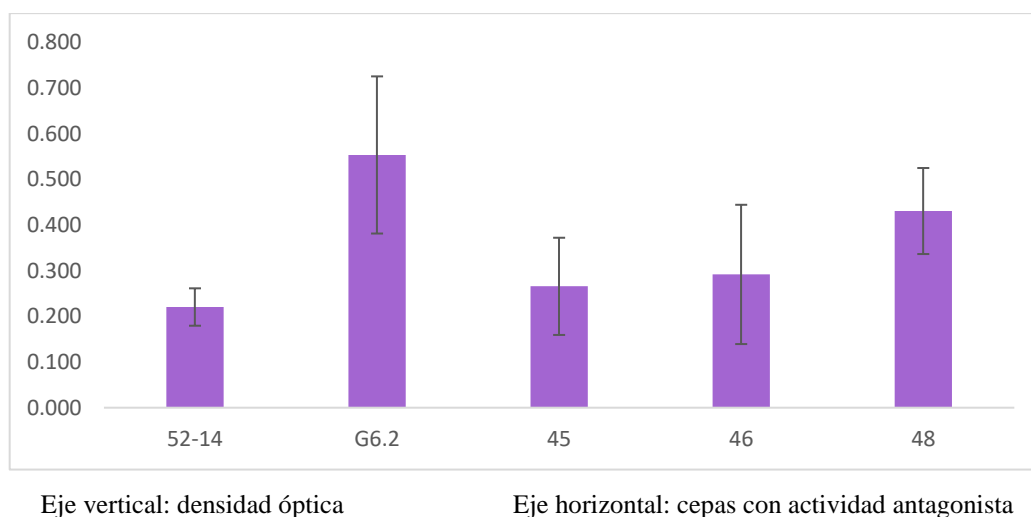


Figura 13. Promedio de la densidad óptica para la producción de biopelícula de los cinco aislamientos microbianos con actividad antagonista.

7.6 Alineamiento de secuencias

Las secuencias de los aislados identificados fueron editadas y enviadas al GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente se realizó un alineamiento, comparación y árbol filogenético usando el programa MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Los códigos de acceso de cada especie fueron incluidos en el árbol, como se muestra en la Figura 14.

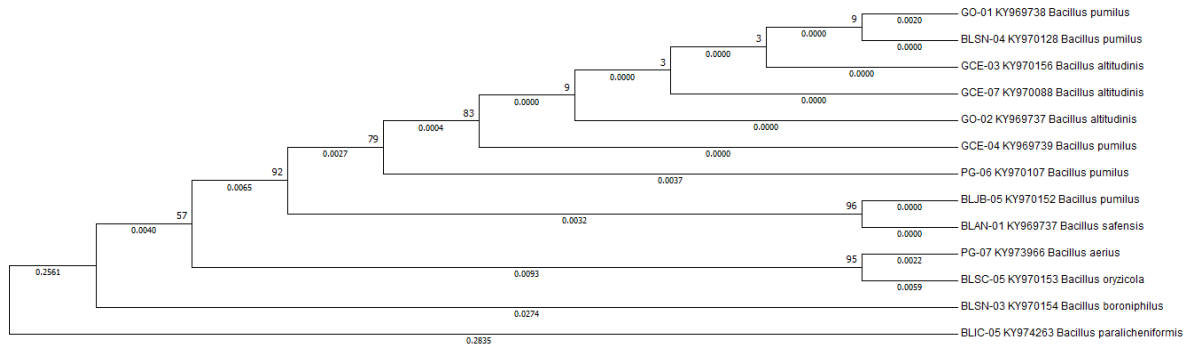


Figura 14. Árbol filogenético del vecino más cercano de los aislados identificados.

8. DISCUSIÓN

En México, la prevalencia de microorganismos resistentes a antibióticos fue considerada de las más altas, teniendo a microorganismos del grupo ESKAPE (*Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*), así como otras bacterias nosocomiales (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella*) y recientemente, especies del genero *Vibrio* (Amabile-Cuevas, 2010; Pendleton *et al.*, 2013; Zavala-Norzagaray *et al.*, 2015). Muy probablemente esto es debido a una serie de factores, como la contaminación y gran cantidad de desechos en el medio ambiente, el uso inadecuado de los antibióticos y la transferencia de genes de resistencia de una bacteria a otra; los cuales ocasionan una adaptación del microorganismo a estos fármacos. La aparición de *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* resistentes ya ha sido reportada en México, así como brotes de este último en el oeste del país y estudios de prevalencia que aumentan cada año MRSA. Esto refuerza la presente necesidad de nuevos tratamientos contra estos patógenos (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006; Villaseñor-Martínez *et al.*, 2012; de Jesús Hernández-Díaz *et al.*, 2015; de León-Rosales *et al.*, 2015).

Los microorganismos aislados en esta investigación provinieron de diferentes sustratos y organismos, entre los cuales se encontraron algas verdes, rojas y marrones, sedimentos marinos, cangrejos, caracoles y jaiba. Existen reportes de cepas productoras de sustancias antibióticas aisladas de algas verdes, rojas y marrones, las cuales fueron evaluadas contra bacterias como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Vibrio*, por mencionar algunas (Lemos *et al.*, 1985; Jayanth *et al.*, 2001, 2002; Avendaño-Herrera *et al.*, 2005). El alga *Enteromorpha* sp. se reportó en el aislamiento de microorganismos antagonistas contra bacterias de importancia clínica y acuícola (Lemos *et al.*, 1985; Chellaram *et al.*, 2011; Wietz *et al.*, 2013). En el caso del alga *Gracilariopsis* sp., no se encontraron reportes de microbiota antagonista. Para las algas de la división Rhodophyta, solo realizaron evaluaciones de extractos crudos contra diversos microorganismos (Ambika y Sujatha, 2015). Cuatro de los 15 aislados

microbianos de Sonora y Quintana Roo que presentaron actividad antimicrobiana provienen de las algas *Gracilariopsis*, sp. (dos aislados), aisladas de Bahía de Lobos, y las algas Rhodophyta, de Playa del Carmen (dos aislados, uno para cada tipo de alga colectada). Esto reafirma la presencia de microorganismos con actividad biológica en contra de bacterias de interés clínico.

Los sedimentos marinos se reportan con presencia de microorganismos antagonistas (Lemos *et al.*, 1985; Long y Azam, 2001). Existen pocos trabajos relacionados con medusas y efectos antimicrobianos, como el de Yue *et al.* (2015), quienes evaluaron la actividad de hongos frente a bacterias y hongos. Este es el primer reporte del aislamiento de microorganismos antagonistas de *Callinectes arcuatus* (Jaiba), *Clibanarius panamensis* (cangrejo ermitaño) y *Crassostrea* sp (ostión).

La actividad antagónica se debe a la capacidad de los microorganismos para producir sustancias extracelulares, las cuales poseen propiedades antimicrobianas frente a un amplio rango de microorganismos (Fariha *et. al.*, 2009). Velho-Pereira y Kamat (2011) mencionan que, al momento de realizar una evaluación antagónica por el método de estría cruzada, es conveniente incubar por un periodo de tiempo prolongado la estría del microorganismo a evaluar, esto para darle suficiente tiempo al organismo para que desarrolle las sustancias antimicrobianas y sean difundidas en el medio. Los aislados marinos de esta investigación permanecieron 48 horas en incubación durante el método de estría cruzada, el cual fue suficiente para que produjeran y difundieran las sustancias que lograron la inhibición de *S. aureus* y *V. parahaemolyticus* por el medio de cultivo.

De los 42 aislamientos, el 7.14% corresponde a cocobacilos Gram positivos, 9.5% a cocos Gram positivos, 26.19% a bacilos Gram negativos y el 57.14% a bacilos Gram positivos. De las 42 cepas, 15 (35.71%) presentaron actividad antagonista frente a *S. aureus* y *V. parahaemolyticus*.

Las cepas con mayor actividad fueron la G6.2, 52-14 y 43 para *S. aureus*; y 52-14, CM48, 45 y 46 para *V. parahaemolyticus*. Con un promedio de 20 mm de inhibición, la cepa G6.2 fue la que presento mayor actividad contra *S. aureus*; y la cepa 52-14 con 15.7 mm para *V. parahaemolyticus* (Figura 11). La identificación de la región 16S rRNA de las cepas mostró en su totalidad especies del género *Bacillus* (Tabla 5). La cepa G6.2 se identificó como *B. aerius* y la 52-14 como *B. pumilus*. Las otras especies de *Bacillus* identificadas fueron *B. oryzicola*, *B. safensis*, *B. lentus*, *B. boroniphilus*, *B. paralicheniformis* y *B. altitudinis*.

La identificación por API 50 CH de las cepas 32 y G6.2 mostraron un 99.9% de identificación de especie al momento de su análisis. La cepa 32, al no haber sido analizada por MacroGen, fue identificada por medio del API como *Bacillus lentus*. La cepa G6.2, identificada por MacroGen como *Bacillus aerius*, fue identificada por la base de datos del APIweb como *Bacillus licheniformis*. Al analizar las secuencias de la cepa G6.2 en la base de datos del GenBank (NCBI), se puede observar que la especie *B. aerius* presenta mayor relación de bases que *B. licheniformis*. Boyd *et al.* (2005) analizaron especies de *Lactobacillus* por medio de secuenciación de la región 16S rRNA, donde concluyen que el uso de técnicas genómicas como la secuenciación del 16S rRNA, son recomendables al momento de su identificación. Bosshard *et al.* (2006), comparó el uso de API 20 NE, VITEK 2 y secuenciación del 16S rRNA para la identificación de bacilos Gram negativos, donde la secuenciación resulto ser la mejor forma de identificación de las tres. Elbanna *et al.* (2014) mencionan que, al momento de discriminar la identidad de una especie, es preferible el uso de técnicas genómicas. Al ser métodos más sensibles y con mayor exactitud al momento de identificar una especie, se puede corroborar el resultado de la secuenciación del 16S rRNA de la cepa G6.2 y su identificación como *B. aerius*.

El género *Bacillus* cuenta con reportes de actividad antagonista, la cual se debe a la producción de una gran variedad de sustancias antimicrobianas, que pueden ser de carácter peptídico y lipopetídico principalmente, y cuentan con la capacidad de ser

utilizados contra microorganismos resistentes a antibióticos. Entre los compuestos producidos por diferentes especies de *Bacillus*, se pueden encontrar la bacitracina, polipeptina, bacilina, esperina y micosubtilina, por mencionar algunos (Katz y Demain, 1977). *B. pumilus* produce micrococcina P, tetaina y pumilina, las cuales podrían haber sido las mismas sustancias que las cepas aisladas de esta especie de Sonora y Quintana Roo produjeron al momento de la evaluación antagonista. Estas sustancias son producidas cuando la bacteria termina su fase logarítmica y entra en la fase estacional, en donde los genes de esporulación comienzan a ser activados, así como los genes que codifican estas sustancias antimicrobianas. Estos genes activan la síntesis de metabolitos especiales tales como los antibióticos peptídicos tirocidina y gramicidina S, así como la surfactina lipopeptídica cíclica (Marahaier *et al.*, 1993). Incluyen los operones *gr* y *tyc* en *Bacillus brevis*, que codifican la sintetasa de gramicidina S y la tirocidina sintetasa, respectivamente, y el operón *srfA* de *Bacillus subtilis* que codifica las enzimas del complejo de surfactina sintetasa. Los genes de la biosíntesis de antibióticos de péptidos están regulados por factores tan diversos como el gen de esporulación temprana *SpoOA*, el regulador de estado de transición *AbrB* y los productos génicos (*ComA*, *ComP* y *ComQ*) requeridos para el inicio de la competencia. (Van-Dinh *et al.*, 2014; Cochrane y Vederas, 2016). Esto ayuda a corroborar el uso del método de estría cruzada al momento de evaluar la actividad antagonista, ya al exponer al bacilo a tiempos prolongados ocasiona la esporulación de este, y a su vez, la activación de la cascada de genes que producen las sustancias antimicrobianas.

El árbol filogenético del vecino más cercano demostró una clara cercanía entre las especies de *B. altitudinis* y *B. pumilus*. Estas dos especies se encuentran estrechamente relacionadas en términos filogenéticos (Mahmud *et al.*, 2015), lo cual se corrobora al momento de observar el árbol. La clasificación actual de especies dentro del género *Bacillus* y géneros relacionados se encuentra bien establecida y se basa en una combinación de numerosos enfoques experimentales (Xu y Côté, 2003). Además, se han realizado muchos estudios filogenéticos, la mayoría de los cuales están sesgados hacia aislamientos terrestres (por ejemplo, *B. subtilis*), particularmente debido a

preocupaciones clínicas sobre ciertos patógenos como *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*. Como alternativas a las secuencias de rRNA 16S, se han probado genes de codificación de proteínas, como *rpoB*, *gyrB*, *nifD*, *recA* y *atpD*, la cual demuestra ser de alta sensibilidad y exactitud (Ki *et al.*, 2009). Un estudio futuro de estas proteínas podría ayudar a la realización de un árbol filogenético más completo al cual se le integrarían los aislados obtenidos en esta investigación.

B. lentus y *B. pumilus* se pueden aislar habitualmente de ecosistemas marinos (Ivanova *et al.*, 2010). Jin (*et al.* (2011) evaluó por primera vez la actividad antagonista de *B. altitudinis*, resultando positiva contra el oomiceto *Phytophthora nicotianae*. Sharma *et al.* (2006) caracterizaron una bacteriocina aislada de cepa una *B. lentus* la cual mostro actividad contra cepas de *Listeria monocytogenes* y *S. aureus*. Collins *et al.* (2016) encontraron lipopéptidos, lantipéptidos y péptidos ciclados con actividad antimicrobiana en *B. pumilus* y *B. paralicheniformis*.

La especie *B. oryzicola* presenta actividad promotora de crecimiento en plantas, así como capacidades antimicrobianas que protegen a la planta (Kloepper *et al.*, 2004;). La cercanía filogenética de *B. paralicheniformis*, *B. boroniphilus* y *B. oryzicola* se puede deber a una actividad promotora de crecimiento vegetal que las tres especies comparten, en la cual producen sustancias antimicrobianas que confieren de resistencia a la planta en contra de fitopatógenos (Chung *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017). Estas sustancias protectoras de plantas pueden tener el potencial para inhibir el crecimiento microbiano, como se observó en la prueba de antagonismo contra *S. aureus* y *V. parahaemolyticus*. Estas especies no demostraron una alta inhibición, lo cual puede deberse a que las sustancias que produjeron no sean las adecuadas para frenar el crecimiento de los dos microorganismos usados. Se ha reportado que *B. lentus* presenta propiedades de aplicación industrial, gracias a una proteasa con estabilidad hacia surfactantes y oxidantes (Deng *et al.*, 2010). Se tienen reportes de la producción de la peptidasa BLAP (*Bacillus lentus* Alkaline Peptidase), que es una enzima ampliamente utilizada en detergentes domésticos (Eisele *et al.*, 2013).

Este es el primer reporte de actividad antagonista de *Bacillus aerius*, *B. oryzicola*, *B. safensis* y *B. boroniphilus* frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

La capacidad productora de las biopelículas formadas por las cepas fue de producción moderada para todas, pero la cepa 52-14 (*B. pumilus*) fue la que formó la mayor cantidad. Las biopelículas tienen potencial para ser utilizadas al momento de la producción de sustancias inhibitorias (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005), lo cual demuestra una aplicación potencial en áreas como la camaronicultura o acuacultura, las cuales son afectadas por especies del género *Vibrio*.

A pesar de la importancia del estudio de biopelículas en el aspecto de producción de antimicrobianos, son escasos los reportes de este tipo de trabajos. Los estudios de D'alvise *et al.* (2014) y Hamza *et al.* (2016) corroboran el uso de las biopelículas para la formación a gran escala de sustancias antimicrobianas. Esto nos podría ayudar a conseguir compuestos puros los cuales serían probados de manera directa sobre los microorganismos de interés clínico. Al poseer un buen nivel de producción de biopelícula, los aislados obtenidos en esta investigación tienen el potencial necesario para producir sustancias con actividad antimicrobiana, las cuales, gracias a los trabajos realizados en el pasado, han demostrado su capacidad inhibitoria la cual es necesaria hoy en día.

Los trabajos de Villarreal-Gómez *et al.* (2010), Cetina (2010), Torres-Beltrán *et al.* (2012) y Luis-Villaseñor *et al.* (2013) demuestran la presencia de microorganismos con propiedades antimicrobianas, provenientes de ecosistemas marinos mexicanos. Jayanth *et al.* (2001) y Pandey *et al.* (2011) mencionan la existencia de una gran cantidad de sustancias con actividad antibacteriana aisladas de bacterias marinas como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Alteromonas*, por lo que la investigación y evaluación de estos microorganismos es un área de estudio con gran potencial de desarrollo.

9. CONCLUSIÓN

Se aisló e identificó, microbiota con capacidades antagonistas frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* de sustratos y especies marinas.

De los 15 aislados con capacidad antagonista, las cepas G6.2, y 52-14, identificadas como *Bacillus pumilus* y *Bacillus aerius*, mostraron la mayor inhibición contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* por medio del método de estría cruzada. Además de esto, y, de acuerdo a la metodología utilizada, estas cepas poseen una capacidad moderada en la formación de biopelículas, al presentar una DO de 0.2 y 0.6, respectivamente.

Este es el primer reporte del aislamiento de *B. aerius*, *B. altitudinis*, *B. oryzicola*, *B. safensis* y *B. boroniphilus* de ecosistemas marinos en México.

Se reportó por primera vez la actividad antagonista de *B. aerius*, *B. oryzicola*, *B. safensis* y *B. boroniphilus* contra bacterias de importancia clínica, por medio del método de estría cruzada.

10. PERSPECTIVAS

Las cepas bacterianas que presentaron la mayor inhibición frente a las bacterias retadas tienen potencial de ser evaluadas contra otras especies de importancia clínica.

Evaluar las capacidades de las biopelículas para la producción de sustancias antimicrobianas.

Identificación de las sustancias antimicrobianas producidas por las cepas bacterianas aisladas, para el aislamiento y prueba de estas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, I., Beg, A. Z., 2000. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 113-123
- Amabile-Cuevas, C. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *The Journal of Infection in Developing Countries* 4(03), 126-131.
- Ambika, S., y Sujatha, K. 2015. Antifungal activity of brown, red and green alga seaweed extracts against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., in pigeonpea var. CO (Rg) 7. *International Journal of Agricultural Sciences* 11(2), 210-216.
- Aranda, C. M. A., y Timaná, C. A. D., 2002. Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 22(4), 192-199.
- Arias-Flores, R., Rosado-Quirab, U., Vargas-Valerio, A., y Grajales-Muñiz, C., 2016. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 54(1), 20-24.
- Avendaño-Herrera, R., Lody M., Riquelme, C. E., 2005. Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en sustratos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(2), 117-125.
- Barbachyn M.R., Ford C.W., 2003. Oxazolidinone structure–activity relationships leading to linezolid. *Angewandte Chemie International Edition* 42:2010–2023.
- Beltz, L.A., 2011. *Emerging Infectious Diseases: A Guide to Diseases, Causative Agents, and Surveillance*. Josey-Bass; San Francisco. pp. 4-5.
- Bernan V.S., M. Greenstein y W.M Maiese. 1997. Marine Microorganisms as a source of new natural products. *Advances in Applied Microbiology* 43: 57-90.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., y Prinsep, M.R., 2009. Marine natural products. *Natural Product Reports* 26: 170–244.
- Bosshard, P. P., Zbinden, R., Abels, S., Böddinghaus, B., Altwegg, M., y Böttger, E. C. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK

- 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology* 44(4), 1359-1366.
- Boyd, M.A., Antonio, M.A., y Hillier, S. L. 2005. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. *Journal of clinical microbiology* 43(10), 5309-5311.
- Burton E., Yakandawala N., LoVetri K., Madhyastha M.S., 2007. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34(1): 1-4.
- Cabanillas-Beltrán, H., Llausás-Magaña, E., Romero, R., Espinoza, A., García-Gasca, A., Nishibuchi, M., y Gómez-Gil, B., 2006. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 in Mexico. *FEMS Microbiology Letters* 265(1), 76-80.
- Cabrera-García M.E., Vázquez-Salinas C. y Quiñones-Ramírez E.I., 2004. Serologic and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* 70: 6401–6406.
- Carte B.K. 1993. Marine natural products as a source of novel pharmacological agents. *Current Opinion in Biotechnology* 4: 275-279.
- Cetina, A., Matos, A., Garma, G., Barba, H., Vázquez, R., Zepeda-Rodríguez, A., López-A, R. (2010). Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of Mexico. *Revista Peruana de Biología* 17(2), 231-236.
- Chellaram, C., An, T. P., Kesavan, D., Priya, G., y Gladis, C. 2011. Enhanced cultivability of antagonistic bacterial strains from soft coral *Sinularia* sp., Gulf of Mannar, Southeastern India. *African Journal of Microbiology Research* 5(12), 1521-1526.
- Chung, E. J., Hossain, M. T., Khan, A., Kim, K. H., Jeon, C. O., y Chung, Y. R. 2015. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. *The plant pathology journal* 31(2), 152.
- Cochrane, S. A., y Vederas, J. C. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal research reviews* 36(1), 4-31.
- Collins, F. W., O'Connor, P. M., O'Sullivan, O., Rea, M. C., Hill, C., y Ross, R. P. 2016. Formicin—a novel broad-spectrum two-component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576. *Microbiology* 162(9), 1662-1671.
- Crowley, Leonard V., 2007. An Introduction to Human Disease: Pathology and Pathophysiology Correlations. Jones y Bartlett Learning; Ontario. pp. 3-4.
- D'alvise, P. W., Magdenoska, O., Melchiorson, J., Nielsen, K. F., y Gram, L., 2014. Biofilm formation and antibiotic production in *Ruegeria mobilis* are influenced

- by intracellular concentrations of cyclic dimeric guanosinmonophosphate. *Environmental microbiology* 16(5), 1252-1266.
- David M.Z, Daum R.S., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiological Reviews* 23(3):616-87.
- de Jesús Hernández-Díaz, L., Leon-Sicairos, N., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., Guadron-Llanos, A. M., Martinez-Garcia, J. J., y Canizalez-Roman, A., 2015. A pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 clone causing most associated diarrhea cases in the Pacific Northwest coast of Mexico. *Frontiers in microbiology* 6, 221.
- de León-Rosales, S. P., Hernández, R. A., y Vidal, Y. L., 2015. La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta médica de México*, 151(5), 681-689.
- Debbab, A., Aly, A. H., Lin, W. H., y Proksch, P., 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microbial biotechnology* 3(5), 544-563.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., y Wen, T., 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource technology* 101(18), 7100-7106.
- Desjardine K., Pereira A., Wright H., Maitainaho T., Kelly M., Andersen R.J., 2007. Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brewibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. *Journal of Natural Products* 70:1850–1853.
- Dreser, Anahí, Wirtz, Veronika J, Corbett, Kitty K, y Echániz, Gabriela, 2008. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México*, 50 (Supl. 4), S480-S487.
- Donlan R.M., 2001. Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerging Infectious Disease* 7(2): 277-281.
- Dufourcq, R., Chalkiadakis, E., Fauchon, M., Deslandes, E., Kerjean, V., Chanteau, S., Petit, E., Guezennec, J. and Dupont-Rouzeyrol, M., 2014. Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine coastal environment from New Caledonia. *Letters in Applied Microbiology* 58: 102–108.
- Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B., y Fischer, L., 2013. Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using *Bacillus lentus* alkaline peptidase. *European Food Research and Technology* 236(3), 483-490.
- Elbanna, K., Elnaggar, S., y Bakeer, A. 2014. Characterization of *Bacillus altitudinis* as a new causative agent of bacterial soft rot. *Journal of Phytopathology* 162(11-12), 712-722.

- Engelkirk P., Duben-Engelkirk J., 2008. Understanding infectious diseases. En: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams y Wilkins; Philadelphia. pp 19-98.
- Espinoza-Tavera, Alejandro, Hernández-Gracia, Guillermo, Cantú-Ramírez, Rubén Celerino, Díaz-López, Arely, Ávila-Aguilar, Selene, García-García, Edgar Alonso, Rivera-Sánchez, Gildardo, y Bocanegra-García, Virgilio., 2014. Prevalencia y perfil de resistencia a antibióticos de microorganismos aislados de infecciones en pie diabético. *CienciaUAT* 9(1), 84-89.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., y Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species Complex. *Frontiers in Microbiology* 8, 22.
- Fariha H., Samiullah K., Aamer A.S., Abdul H., 2009. Production of Antibacterial Compounds by Free and Immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. *Pakistan Journal of Botany* 41(3): 1499-1510.
- Fenical, W., 1993. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews* 93(5), 1673-1683.
- Figueroa B.E., 2005. Biodiversidad marina: valoración, usos y perspectivas: hacia dónde va Chile? Editorial Universitaria, Santiago de Chile. pp. 356.
- Gales A.C., Castanheira M., Jones R.N., 2012. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73(4):354-60.
- García-Moreno, M., de la Garza-Ramos, M., Martínez-Ávila, G., Gutiérrez-Diez, A., Ojeda-Zacarías, M., y Aguirre-Arzola, V., 2017. Inhibición de la expresión del sistema agr de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mediante el uso de polifenoles totales de hojas de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*). *Nova Scientia* 9(18), 200-221.
- Gautam, K., Prasanna, J., Mahadevan, G., Mahendran, S y Sahu, S.K, 2013. Isolation, indentification of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* *grl* from marine sediments and screening of its antibacterial potential. *International Journal of Recent Scientific Research* 4 (5): 536- 542,
- Hamza, F., Kumar, A. R., y Zinjarde, S., 2016. Antibiofilm potential of a tropical marine *Bacillus licheniformis* isolate: role in disruption of aquaculture associated biofilms. *Aquaculture Research* 47(8), 2661-2669.
- Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V. V. y Yoshikawa, S. 2010. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International microbiology* 2(4), 267-271.

- Jayanth, K., Jeyasekaran, G., y Shakila, R. J. 2001. Biocontrol of fish bacterial pathogens by the antagonistic bacteria isolated from the coastal waters of Gulf of Mannar, India. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists* 21(1), 12-18.
- Jayanth, K., Jeyasekaran, G., y Shakila, R. J. 2002. Isolation of marine bacteria, antagonistic to human pathogens. *Indian Journal of Marine Sciences* 31(1), 39-44.
- Jensen P.R., W. Fenical. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annual Review of Microbiology* 48: 559-584.
- Jin, F., Ding, Y., Ding, W., Reddy, M. S., Fernando, W. G., y Du, B. 2011. Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. *International Journal of Molecular Sciences* 12(5), 3055-3071.
- Katayama Y., Ito T, Hiramatsu K., 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1549-1555.
- Katz, E., Demain, A. L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Reviews* 41(2), 449.
- Ki, J. S., Zhang, W., y Qian, P. Y., 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiological Methods* 77(1), 48-57.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., y Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11), 1259-1266.
- Knobloch, J. K.-M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.-H., y Mack, D. 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB Operon: Differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology* 183(8), 2624–2633.
- Lemos, M. L., Toranzo, A. E., y Barja, J. L. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology* 11(2), 149-163.
- Lertcanawanichakul M., Sawangnop S., 2008. A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species Walailak J. *Science & Technology* 5(2): 161-171.
- Liu, C., Wang, K., Jiang, J. H., Liu, W. J., y Wang, J. Y., 2015. A novel bioflocculant produced by a salt-tolerant, alkaliphilic and biofilm-forming strain *Bacillus agaradhaerens* C9 and its application in harvesting *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Biochemical Engineering Journal* 93, 166-172.
- Long, R. A., y Azam, F. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 4975-4983.

- Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D., Clark D.P., 2011. Brock Biology of Microorganisms (13th Edition) San Francisco, California, pp 674-675.
- Mahmud, R. S., Ulyanova, V., Malanin, S., Dudkina, E., Vershinina, V., y Ilinskaya, O., 2015. Draft whole-genome sequence of *Bacillus altitudinis* strain B-388, a producer of extracellular RNase. Genome Announcements 3(1), e01502-14.
- Marahier, M. A., Nakano, M. M., y Zuber, P. 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. Molecular Microbiology 7(5), 631-636.
- Marín-Galvín, R., 2003. Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Ediciones Díaz de Santos, España pp. 79.
- Martinez-Urtaza, J., Bowers, J. C., Trinanès, J., y DePaola, A., 2010. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. Food Research International 43(7), 1780-1790.
- Mayer, A., Rodríguez, A. D., Taglialatela-Scafati, O., y Fusetani, N., 2013. Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. Marine Drugs 11(7), 2510-2573.
- Mesa A., A. C., Bueno S. J. G. y Betancur G. L. A. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. Revista Española de Quimioterapia 17 (4): 325-331.
- Miles, D. W., Ross, T., Olley, J., y McMeekin, T. A., 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. International Journal of Food Microbiology 38, 133–142.
- Morens D.M., Folkers G.K., Fauci A.S., 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. Nature 430: 242-249.
- Morita, Y., y Li, X. Z., 2016. Antimicrobial Resistance and Drug Efflux Pumps in *Vibrio* and *Legionella*. In Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria. Springer International Publishing (pp. 307-328).
- Mounier, J., Camus, A., Mitteau, I., Vaysse, P. J., Goulas, P., Grimaud, R., y Sivadon, P., 2014. The marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 degrades a wide range of lipids and hydrocarbons through the formation of oleolytic biofilms with distinct gene expression profiles. Microbiology Ecology 90(3), 816-831.
- Novales M., Guadalupe M., 2011. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. Boletín médico del Hospital Infantil de México 68(4), 262-270.
- Ong, K. Y., Chin, H. S. and Teo, K. C., 2011. Biological screening of microbes isolated from soil of ex-tin mining land in Kampar Area. African Journal of Microbiology Research 5(27), 4757-4763.

- Pandey A., Naik M.N., Dubey S.K., 2011. Biological characterization of marine fish pathogen, *Acinetobacter* sp. strain An 2 producing antibacterial metabolites. *Journal of Scientific and Industrial Research* 70: 135-141.
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., y Gilmore, B. F. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 11(3), 297-308.
- Reichenbach H. 2001. *Myxobacteria* producers of novel bioactive substances. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 27: 149-156.
- Romano, G., Costantini, M., Sansone, C., Lauritano, C., Ruocco, N., y Ianora, A., 2017. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Marine Environmental Research* 128, 58-69.
- Saha A., Santra S.C., 2014. Isolation and characterization of bacteria isolated from municipal solid waste for production of industrial enzymes and waste degradation. *Journal of Microbiology & Experimentation* 1(1):3.
- Sharma, N., Kapoor, G., y Neopaney, B. 2006. Characterization of a new bacteriocin produced from a novel isolated strain of *Bacillus lentus* NG121. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3-4), 337-343.
- Secretaría de Salud, 2011. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones Públicas de salud. México: SSA. [citado 22 Junio 2017]. Disponible en http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/estudios_especiales/NOSOCOMIAL_IF.pdf
- Silva S., 2006. Resistencia a antibióticos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48 (2): 105-112.
- Sievert D.M., Ricks P., Edwards J.R., Schneider A., Patel J., Srinivasan A., 2013. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 34(1):1-14.
- Solórzano F., Miranda M. G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 136-141.
- Torres-Beltrán M., Cardoso-Martínez F., Millán-Aguíñaga N., Becerril-Espinosa A., Soria-Mercado I.E., 2010 Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas. *Ciencias Marinas* 38(4): 609–624.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L., 2007. Introducción a la microbiología 9º Edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina. pp. 2.
- Van-Dinh, T. T., Bui, N. H. L., Doan, M. P., y Trinh, T. T. 2014. Identification of antibiotic-producing *Bacillus sensu lato* isolated from national parks of Hoang Lien and Phu Quoc in Vietnam. *Journal of Vietnamese Environment* 6(1), 77-83.

- Velázquez-Meza, M.E., Aires de Sousa, M., Echaniz-Aviles, G., Solorzano-Santos, F., Miranda-Navales, G., Silva-Sanchezm J., y de Lencastre, H. 2004. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *Journal of Clinical Microbiology* 42:3877-3880.
- Velazquez-Roman, J., Leon-Sicairos, N., Flores-Villasenor, H., Villafana-Rauda, S., and Canizalez-Roman, A., 2012. Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1794–1803. doi: 10.1128/AEM.06953-11.
- Velho-Pereira, S., Kamat, N. M., 2011. Antimicrobial Screening of *Actinobacteria* using a Modified Cross-Streak Method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 73(2), 223–228.
- Villarreal-Gómez, Luis J., Soria-Mercado, Irma E., Guerra-Rivas, Graciela, y Ayala-Sánchez, Nahara E., 2010. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(2), 267-275.
- Villaseñor-Martínez, R., Farías-Flores, G., Carrillo-Macías, M.E., Jáuregui-Lomelí, J.J., Castañeda-Rico, F.E., Lepe-Cruz, B.E., Martínez-Ramírez, R., y Villaseñor-Sierra, A. 2012. *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) en un Hospital pediátrico, comunidad urbana y rural. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 32:6-10.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., y Kolter, R., 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology* 11(3), 157-168.
- Wietz, M., Duncan, K., Patin, N. V., y Jensen, P. R. 2013. Antagonistic interactions mediated by marine bacteria: the role of small molecules. *Journal of Chemical Ecology* 39(7), 879-891.
- Xu, D., Côté, J.C., 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 53, 695–704.
- Yue, Y., Yu, H., Li, R., Xing, R., Liu, S., y Li, P. 2015. Exploring the Antibacterial and Antifungal Potential of Jellyfish-Associated Marine Fungi by Cultivation-Dependent Approaches. *Plos One*, 10(12).
- Zavala-Norzagaray, A. A., Aguirre, A. A., Velazquez-Roman, J., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N., Ley-Quíñonez, C. P., Canizalez-Roman, A. 2015. Isolation, characterization, and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. in sea turtles from Northwestern Mexico. *Frontiers in Microbiology* 6, 635.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Jesús Mario Iracheta Villarreal

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: ACTIVIDAD ANTAGONISTA IN VITRO DE MICROBIOTA DE BAHIA DE LOBOS Y BAHIA DE GUASIMAS, SONORA Y PLAYA DEL CARMEN, QUINTANA ROO CONTRA *Staphylococcus aureus* Y *Vibrio parahaemolyticus*.

Campo de Estudio: Prevención de enfermedades. Microbiología marina.

Datos Personales: Nacido el 11 de diciembre de 1992 en Monterrey, Nuevo León, México. Hijo de Mario Iracheta Suarez y Matilde Alicia Villarreal Santos.

Educación Personal: estudios en la Preparatoria #7 Puentes y carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.